

Rec'd PCT/PTO 28 JAN 2005

10/523161 #2

PCT/CN03/00378

证 明

REC'D 07 JUL 2003

WIPO PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 07 31

申 请 号： 02 1 33567.2

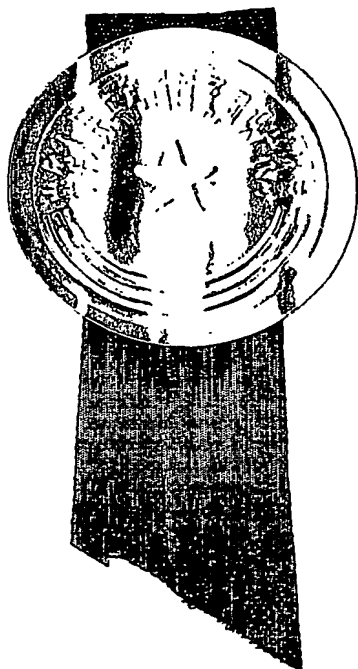
申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 疯牛病病原检测压电生物芯片及其制备方法

申 请 人： 中华人民共和国北京出入境检验检疫局；重庆大学

发明人或设计人： 魏传忠；莫志宏；马贵平；靳萍；李冰玲；田学隆；田海燕；郭钢

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 6 月 4 日

BEST AVAILABLE COPY

权 利 要 求 书

1、一种疯牛病病原检测压电生物芯片，包括压电片(1)及分别固定在压电片下、上面的共用电极(2)和微型电极阵列(3)，其特征在于在微型电极阵列(3)的各电极上一一对应地固定有不同的疯牛病朊蛋白抗体，构成疯牛病朊蛋白的抗体阵列(4)。

2、根据权利要求1所述的疯牛病病原检测压电生物芯片，其特征在于疯牛病朊蛋白抗体阵列(4)是在微型电极阵列的各电极上固定1—1000纳米厚的朊蛋白的抗体组成，抗体阵列是由各种N端氨基酸序列及其正常或变异两种构型的朊蛋白的抗体构成。

3、根据权利要求2所述的疯牛病病原体检测压电生物芯片，其特征在于疯牛病朊蛋白抗体阵列由N端氨基酸序列I、II、正常的和变异的朊蛋白抗体组成，朊蛋白抗体的厚度为100—150纳米。

4、根据权利要求2所述的疯牛病病原体检测压电生物芯片，其特征在于疯牛病朊蛋白抗体阵列由N端氨基酸序列I、II、III、正常的和变异的朊蛋白抗体共6种组成，抗体的厚度为100—150纳米。

5、根据权利要求2所述的疯牛病病原体检测压电生物芯片，其特征在于疯牛病朊蛋白抗体阵列由N端氨基酸序列I、II、III、IV、正常的和变异的朊蛋白抗体共8种组成，抗体的厚度为100—500纳米

6、一种疯牛病病原检测压电生物芯片的制备方法，其特征在于：

(1)、制作微型电极阵列；

(2)、采用物理吸附、或化学键合、或交联、或包埋、或自组装方法将脲蛋白抗体固定在微型电极阵列(3)的电极上，固定抗体的环境温度为大于零而小于或等于 70°C、固定时间为 0.1—24 小时，使脲蛋白抗体的构型在固定前后保持不变。

7、根据权利要求 6 所述的疯牛病病原体检测压电生物芯的制备方法，其特征在于由多聚甲醛 4%、戊二醛 25%、pH 为 6~8 的磷酸缓冲液 10%、余量为水组成的固定剂，用固定剂且采用交联法将抗体固定在微型电极阵列的电极上，固定温度为 4°C，固定时间为 8 小时。

8、根据权利要求 6 所述的疯牛病病原体检测压电生物芯的制备方法，其特征在于由乙基-二甲基氨基丙基碳亚胺盐酸盐 2%，戊二醛 25%，pH 为 6~8 的磷酸缓冲液 10%、余量为水组成的固定剂，用固定剂且采用交联法将抗体固定在微型电极阵列的电极上，固定温度为 15°C，固定时间为 4 小时。

9、根据权利要求 6 所述的疯牛病病原体检测压电生物芯的制备方法，其特征在于抗体通过生物素和亲合素自组装固定在微型电极阵列的电极上，固定温度为 25°C，固定时间为 2 小时。

说明书

疯牛病病原检测压电生物芯片及其制备方法

技术领域：

本发明涉及动物检验检疫装备及制备方法，特别适用于疯牛病病原体检测。

背景技术：

疯牛病是由非常规致病因子朊蛋白引起的一种亚急性海绵状脑病。如 Prusiner 在 *Ann. Rev. Microbiol.*, 43, pp345-374 (1989)上发表的文章“Scrapie Prions”所述，疯牛病病原羊痒病相关纤维是由变异的抗蛋白酶朊蛋白组成。由于该朊蛋白对一些理化因素的抵抗力很强，大大高于已知的各类微生物和寄生虫，其传染性强、危害性大的特性极不利于人类和动物的保健，越来越引起人类的恐慌和关注。因此对作为疯牛病病原的朊蛋白的检测具有重要意义。

对各种蛋白的检测主要有免疫学检测，即用待测蛋白作为抗原制备出对应的抗体，根据抗原抗体进行免疫化学反应形成免疫复合物的性状与活性特点，对该蛋白进行定性、定位或定量的检测。现有对疯牛病病原变异朊蛋白的检测，也主要是基于免疫学检测包括免疫电泳、放射免疫分析、荧光免疫分析和酶联免疫分析等各种技术。如 Schmerr 等在 *Journal of Chromatography A*, 853, 207-14 (1999)上发表的文章“Use of Capillary Electro-phoresis and Fluorescent Labeled Peptides to Detect the Abnormal Prion Protein in the Blood of Animals that are Infected with a Transmissible Spongiform Encephalopathy”，以及 Bieschke 等在 *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*, 97(10), 5468-73A(2000)发

表的文章“Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets”所述，分别采用荧光标记的毛细管免疫电泳和共聚焦双色荧光光谱技术，检测出疯牛病变异朊蛋白。这些检测装置在使用时都需采用同位素、荧光素或酶等标记朊蛋白或朊蛋白的抗体，因此，对检测条件有极其严格的要求，检测设备复杂、成本高，而且操作冗繁，难以实现自动化。

生物芯片是近年来发展十分迅速的一种生化分析装置。压电生物芯片，如重庆大学向国家知识产权局申请的发明专利，其申请号 991174402，发明名称“微型压电谐振式传感器阵列芯片”，和莫志宏等申请的发明专利，其申请号 001131109，发明名称“原位生物芯片及其制备方法”，它们将多个压电生物传感器集成在一个芯片上，当将芯片上的各电极与配套使用的振荡电路联接时形成独立的谐振检测单元。测量各检测单元的响应信号如器件的谐振频率、声电阻抗谱、频谱或相位等，可获取有关目标组分或多元组分体系的成分、性状的一维或多维信息，得到目标的全面、动态、实时或在位描述。但已公开的这种压电生物芯片不能提供检测疯牛病病原的信息。目前，国内、外还没有关于采用生物芯片检测疯牛病病原的报导。

发明内容：

本发明的目的在于提供一种疯牛病病原检测压电生物芯片及其制备方法，该芯片能实时检测疯牛病病原的信息。

为实现上述发明的目的，本发明包括压电片、固定在压电片下面的共用电极及固定在压电片上面的微型电极阵列、在微型电极阵列各电极上一一对应地固定有不同的疯牛病朊蛋白抗体，形成其抗体阵列，来构成疯牛病病原检测压电生物芯片。

本发明的疯牛病病原检测压电生物芯片(参见附图 1、附图 2)，包含压电材料的压电片(1)、共用电极(2)、微型电极阵列(3)、微型电极上的疯

牛病朊蛋白抗体阵列(4)。上述压电片的表面是光整表面,电极有分别在压电片的下、上两面的共用电极(2)和由至少两个相互隔离的微型电极构成的微型电极阵列(3),朊蛋白抗体是与各种朊蛋白相对应的抗体,各种朊蛋白抗体一一对应地固定在微型电极阵列的各个电极上,构成有至少一种朊蛋白抗体的朊蛋白抗体阵列(4)。

上述的疯牛病朊蛋白抗体阵列(4),可以是各种 N 端氨基酸序列的朊蛋白及其正常或变异构型的抗体,从而使压电生物芯片成为疯牛病病原检测压电生物芯片。

上述的疯牛病朊蛋白抗体,可以采用吸附、或键合、或交联、或包埋、或自组装方法固定于微型电极上。固定抗体与电极的结合强度和与待测蛋白的反应活性与所采用的固定方法、固定剂的组成及 pH 值、固定温度与时间等因素有关。特别是采用交联法或自组装法、固定剂 pH 值为 4~10、固定抗体的环境温度为大于零而小于 70°C,固定时间 0.1—24 小时,使朊蛋白抗体的构型在固定前后保持不变,可使固定抗体具有较强的结合强度和反应活性。

本发明所采用的疯牛病朊蛋白抗体阵列与压电谐振阵列结合,是将朊蛋白抗体阵列的各种抗体分子一一对应固定在压电谐振阵列的各个微型电极上,形成疯牛病各种朊蛋白的检测位点。各种朊蛋白的检测位点组成朊蛋白检测阵列,其整体构成疯牛病病原检测压电生物芯片。

本发明的疯牛病病原检测压电生物芯片与检测仪配套使用,配装时将共用电极和微型电极阵列与检测仪的压电谐振检测电路接口一一对应联接,从而构成压电生物芯片检测系统。进行疯牛病病原检测时,将样品置于芯片上,当抗体与疯牛病朊蛋白进行免疫化学反应时,利用各检测位点的谐振频率与该位点的表面质量成反比,通过测量各检测位点的谐振频率可实时或在位检测相应各位点免疫反应的动态进程,从而对疯牛病相应各

种朊蛋白进行定性和定量分析。

本发明与已有技术比较，具有如下的优点和效果。

首先，本发明所采用的疯牛病朊蛋白抗体阵列可以是根据诊断的对象或需要设计组合而成，即将多种朊蛋白的抗体组合成一组疯牛病朊蛋白抗体阵列，使本疯牛病病原检测压电生物芯片可同时对多种朊蛋白进行检测，达到对疯牛病病原进行准确、快速检测的目的，并具有无须标记、使用简便、高特异性、高检测效率的优点。

其次，本发明与检测仪配套采用频率测量，能对本芯片上各检测位点同时进行高灵敏度、高精度地实时、在位检测；且能使检测设备简化、易于小型化。

再者，本发明的芯片结构简单，制作方法简便、易于大批量制备、成本低廉。

本发明的疯牛病病原检测压电生物芯片与检测仪配套使用，适用于疯牛病的早期、高效和快速诊断。

附图说明：

图 1 是图 2 中的 A—A 剖面图。

图 2 是图 1 的俯视图。

图 3 是本发明的对应一种朊蛋白抗体阵列的四种朊蛋白(I~IV)的 N 端氨基酸序列。

图 4 是本发明的一种自组装抗体及其与朊蛋白结合的结构图。

图 1、2 中，1 为压电片，2 为共用电极，3 为微型电极阵列，4 为疯牛病朊蛋白抗体阵列，5 为通电导线，6 为芯片支撑体。

图 3 中，N 端氨基酸序列根据国际理论与应用化学联合会 IUPAC 标准给出，字母分别代表下列氨基酸：A-丙氨酸、C-半胱氨酸、D-天冬氨酸、E-谷氨酸、F-苯丙氨酸、G-甘氨酸、H-组氨酸、I-异亮氨酸、K-赖氨酸、

11

L-亮氨酸、M-蛋氨酸、N-天冬酰胺、P-脯氨酸、O-谷酰胺、R-精氨酸、S-丝氨酸、T-苏氨酸、V-缬氨酸、W-色氨酸、Y-酪氨酸。

图 4 中, 7 为生物素, 8 为亲合素, 9 为朊蛋白。

具体实施方式:

本发明的疯牛病病原检测压电生物芯片, 如附图 1、2 所示, 由压电片、共用电极、微型电极阵列、疯牛病朊蛋白抗体阵列、芯片支撑体构成。

上述压电片 1 选用石英晶体, 也可以选用压电陶瓷、或压电聚偏氟乙烯薄膜等压电材料。采用通常方法制成表面光整的平片形, 其片面呈为 n 边型, 且 $n \geq 3$, 即可以是三边形、四边形、五边形等多边形。

上述共用电极 2、微型电极阵列 3 分别被覆在压电片 1 下、上两面上。采用通常的金、银、铝等导电材料。用真空蒸镀法将导电材料镀覆在压电片的两侧片面上形成导电膜, 在压电片的一侧片面上的导电膜成为共用电极 2; 用光刻法或化学腐蚀法按设计的阵列图形, 将压电片 1 的另一侧的片面上导电膜制成由多个相互隔离呈均匀分布的阵列形的微型电极组成的微型电极阵列 3。

上述疯牛病朊蛋白抗体阵列 4 是由各种 N 端氨基酸序列朊蛋白的抗体、包括正常或变异两种构型的朊蛋白的抗体构成, 疯牛病朊蛋白抗体阵列是在微型电极阵列的各电极上固定 1—1000 纳米厚的朊蛋白的抗体组成。

上述疯牛病朊蛋白抗体的固定, 是利用电极金属与抗体分子间的范德华力、静电力、亲和力的物理性质, 使朊蛋白抗体物理吸附固定在电极表面; 或是利用抗体分子一端含有的反应性游离基, 如羟基、羧基、氨基, 与电极表面经预处理具有的对应官能基发生共价键合, 使朊蛋白抗体化学键合固定在电极表面; 或是采用具有反应性多官能性基的固定剂, 例如戊二醛, 使抗体分子之间产生交联的结构, 从而使朊蛋白抗体交联固定在电

极表面；或是将朊蛋白抗体包埋在电极表面的多孔性聚合物中；或是利用生物素化蛋白质与亲合素的亲和力将朊蛋白抗体自组装在电极上。

上述疯牛病朊蛋白抗体的固定化方法，特别是交联法和自组装法，通过选择适当的固定剂，并控制固定温度为大于零而小于或等于 70°C、固定剂的 pH 值为 4~10，使固定抗体具有较大的结合强度和反应活性。

疯牛病朊蛋白抗体的交联固定方法，可采用包括甲醛、多聚甲醛、戊二醛等的醛类固定剂、或包括碳化二亚胺、二甲基乙酰胺、二甲基辛酰亚胺等的非醛类固定剂、或醛类与非醛类混合的固定剂。固定剂中还包含调节 pH 值的缓冲剂，如常用的磷酸盐、醋酸盐等。

疯牛病朊蛋白抗体的自组装固定方法，如附图 4 所示，电极(3)表面自组装一层生物素(7)，再在上面自组装一层亲合素(8)，生物素化的朊蛋白抗体(4)与其结合，从而自组装固定在电极表面。该生物素化的朊蛋白抗体(4)捕获结合待测的朊蛋白(9)，此法由于电极表面抗体排列有序，具有良好的灵敏度和稳定性。

上述芯片支撑体 6 选用陶瓷，也可以选用塑料、或玻璃等绝缘材料。压电片 1 的边缘通过热压或用胶粘剂，固定于支撑体 6 的周边的上部。支撑体 6 的作用是支撑压电片，组装时要求微型电极及其上的朊蛋白抗体不与支撑体 6 相接触。从而制成本发明的疯牛病病原检测压电生物芯片。

实施例 1

本发明的一种疯牛病病原检测压电生物芯片。

本实施例的压电片 1 为 100 μ m 厚的石英晶体片，微型电极膜 3 及其引脚 5 为 200nm 厚的金膜，压电片 1 与微型电极 3 形状均为四边形，抗体阵列 4 由 N 端氨基酸序列分别为前述 I 和 II、正常和变异的朊蛋白抗体，共 4 种朊蛋白抗体组成，支撑体 6 为陶瓷。抗体 4 用固定剂且采用交联法固定于微型电极 3 上，朊蛋白抗体的厚度为 100—150 纳米，固定剂为多

聚甲醛 4%、戊二醛 25%、pH 为 6~8 的磷酸缓冲液 10%、余量为水。固定温度为 4℃，固定时间为 8 小时。本实施例可用于 N 端氨基酸序列为 I 和 II 变异朊蛋白疯牛病病原的同时定性检出和定量分析。

实施例 2

本发明的一种疯牛病病原检测压电生物芯片。

本实施例的压电片 1 为 80μm 厚的石英晶体片，微型电极膜 3 及其引脚 5 为 150nm 厚的银膜，压电片 1 与微型电极形 3 状均为圆形，抗体阵列 4 由 N 端氨基酸序列分别为前述 I、II 和 III、正常和变异的朊蛋白抗体，共 6 种朊蛋白抗体组成，支撑体 6 为塑料。抗体 4 采用交联法固定于微型电极 3 上，抗体厚度为 100—150 纳米，固定剂为乙基-二甲基氨基丙基碳亚胺盐酸盐 2%、戊二醛 25%、pH 为 6~8 的磷酸缓冲液 10%、余量为水。固定温度为 15℃，固定时间为 4 小时。本实施例可用于 N 端氨基酸序列为 I、II 和 III 变异朊蛋白疯牛病病原的同时定性检出和定量分析。

实施例 3

本发明的一种疯牛病病原检测压电生物芯片。

本实施例的压电片 1 为 200μm 厚的压电聚偏氟乙烯片，微型电极膜 3 及其引脚 5 为 100nm 厚的金膜，压电片 1 和微型电极 3 形状均为四边型，抗体阵列 4 由 N 端氨基酸序列分别为前述 I、II、III 和 IV、正常和变异的朊蛋白抗体，共 8 种朊蛋白抗体组成，支撑体 6 为塑料。抗体 4 通过生物素和亲合素自组装固定于微型电极 3 上，抗体厚度为 100—500 纳米，固定温度为 25℃，固定时间为 2 小时。本实施例可用于 N 端氨基酸序列为 I、II、III 和 IV 变异朊蛋白疯牛病病原的同时定性检出和定量分析。

上述实施例疯牛病病原检测压电生物芯片的最低检出量为 1-10 ng/mL，可在 10 分钟内一次完成对多种朊蛋白的同时测定。

说明书附图

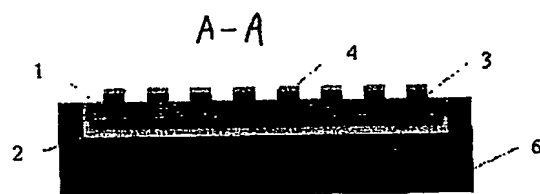


图 1

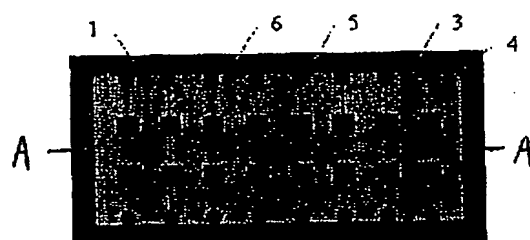


图 2

- I: MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGO-44
 II: GSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGQGP-87
 III: GGGGWGQGGSHSQWNKPSKPPKTNMKHVAGAAAGAW/GGLSGY-131
 IV: MLGSAMSSPLIHFGNDYEDRYTRENMYRYPNQVYYRPVDRYSNQNN-177

图 3

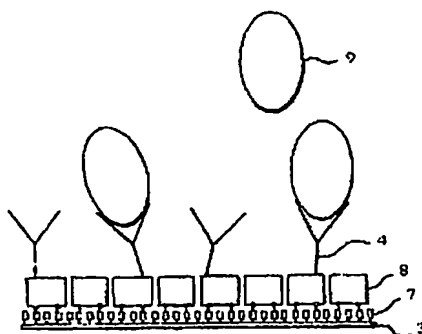


图 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.